

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Februar 2004 (12.02.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/013625 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 27/447

(74) Anwalt: MAUÉ, Paul Georg; Solvias AG, Patents, WKL-
402.3.04, Klybeckstrasse 191, CH-4002 Basel (CH).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/050350

(22) Internationales Anmeldedatum:
30. Juli 2003 (30.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
2002 1344/02 31. Juli 2002 (31.07.2002) CH

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SOLVIAS AG [CH/CH]; Klybeckstrasse 191, CH-4057 Basel (CH). UNIVERSITÄT BIELEFELD [DE/DE]; Universitätsstrasse 25, 33615 Bielefeld (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ANSELMETTI, Dario [CH/DE]; Schwarzbachtal 23, 33824 Werther (DE). RÖGENER, Jan, Sebastian [DE/DE]; August-Bebel-Strasse 79, 33602 Bielefeld (DE). SCHIERENBERG, Marc-Oliver [DE/DE]; Ringstrasse 52, 91074 Herzogenaurach (DE). KALMAN, Franka [DE/DE]; Geissbühl 3, 79585 Steinen (Hofen) (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR MEASUREMENT

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND MESSVERFAHREN

(57) Abstract: Substances either separated or not by means of 1D or 2D flat bed electrophoresis or chromatography can be directly measured without pre-marking, by means of measuring the fluorescence thereof in the UV region with a UV detector, the above being stimulated by means of irradiation with UV light in the wavelength range of 140 to 320 nm.

(57) Zusammenfassung: Mittels 1 D- oder 2D-Flachbettelektrophorese oder -chromatographie nicht getrennte und getrennte Substanzen können direkt und ohne vorherige Markierung bestimmt werden, wenn man deren Eigenfluoreszenz im UV-Bereich mit einem UV-Detektor misst, die durch Bestrahlung mit UV-Licht im Wellenlängenbereich 140 bis 320 nm angeregt wird.

WO 2004/013625 A1

Vorrichtung und Messverfahren

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung mit einer UV-Strahlungsquelle, optischen Elementen zur Führung von UV-Anregungsstrahlung, ein Trennmedium einer Flachbettelektrophorese, auf dem sich ungefärbte, getrennte Flecken elektrophoretisch trennbarer Substanzen befinden, optischen Elementen zur Führung von UV-Fluoreszenzstrahlung, und einem UV-Detektor. Die Vorrichtung wird zur direkten Messung und zum Nachweis elektrophoretisch trennbarer Substanzen mittels natürlicher Fluoreszenzstrahlung im UV-Bereich verwendet.

Zur Trennung elektrisch geladener Moleküle nach Masse und/oder elektrischer Ladung hat sich die Elektrophorese und besonders die Gelelektrophorese seit langem bewährt. Die Methode wird zur qualitativen und quantitativen Analyse von pharmazeutischen Wirkstoffen und Pestiziden sowie deren Metaboliten, zur Trennung und Untersuchung von Aminosäuren, Oligo- und Polypeptiden (Proteine), DNA, RNA, monomeren, oligomeren und polymeren Sacchariden, und anderen biologischen Substanzen in Zellen und Körperflüssigkeiten eingesetzt. In letzter Zeit hat besonders die Gelelektrophorese bei der Untersuchung von Zellen (Proteomics) an Bedeutung zugenommen. Neben der Gelelektrophorese in Kolonnen (Tiseliusapparatur) für einen präparativen Masstab ist die Kapillargelelektrophorese zur Trennung von Mikromengen und die Flachbettelektrophorese mit verschiedenen flächenförmigen Trennmedien auf anorganischer oder organischer Basis (Silicagele, Metalloxide, Papier, Zellulosen, Agarosegele, Dextrangele, Polymergele, Membranen und besonders Polyacrylamidgele) in horizontalen oder vertikalen Elektrophoreseapparaturen bekannt. Die elektrophoretische Trennung kann entsprechend verschiedener Trennmechanismen durchgeführt werden, zum Beispiel entsprechend des Verhältnisses von Grösse zu Ladung, der Verschiedenheit der isoelektrischen Punkte (isoelektrische Fokussierung) oder entsprechend der Grösse, wozu Gradientengele oder geladene SDS-Komplexe verwendet werden. Eine Kombination der isoelektrischen Fokussierung und der SDS-PAGE Elektrophorese wird als 2-D Gelelektrophorese bezeichnet, die sich besonders bei Zelluntersuchungen (Proteomics) durchgesetzt hat. Wird die Trennung auf flachen Trägern nur in einer Dimension ausgeführt, spricht man von 1-D Flachbettelektrophorese.

Die Detektion von zu analysierenden Substanzen erfolgt vorteilhaft mit Hilfe spektroskopischer Methoden wie zum Beispiel Absorption oder Fluoreszenz, wobei die Aufnahme des Absorptionsspektrums und das Messen bei charakteristischen Wellenlängen einer Lumineszenzstrahlung üblicherweise in der Kapillarelektrophorese [siehe zum Beispiel U. B. Soetbeer et al. In Journal of Chromatography B, 745 (2000), Seiten 271 bis 278] oder der Flüssigkeitschromatographie (HPLC) angewendet wird. Die in der Kapillargelelektrophorese verwendeten Gele sind flüssig (Austauschgele), und Messungen einer natürlichen Fluoreszenz sind hier wie in der Flüssigkeitschromatographie kein Problem, da bezüglich Absorption und Hintergrundstrahlung der Flüssigkeiten kaum Störungen beobachtet werden.

Bei der 1D- und 2D-Flachbettelektrophorese, bei der feste Trennmedien eingesetzt werden, ist die Bestimmung von nicht sichtbaren Substanzen durch Absorption mit der notwendigen Empfindlichkeit bisher nicht möglich, da der Hintergrund der Trennmedien (Träger und Puffersystem) im niedrigen UV-Bereich (190 bis 280 nm) zu hoch ist. Auch mit sehr dünnen, UV-transparenten Gelen konnte dieses Problem nicht beseitigt werden.

Es werden daher meist substanzspezifische Färbeverfahren verwendet, um nach der Trennung die Bereiche der Substanzen (Spots, Lanes) direkt oder über digitale Abbildungsverfahren auf den Flächen sichtbar zu machen und gegebenenfalls zur Quantifizierung heranzuziehen. Einen Überblick zu den verschiedenen Färbemethoden gibt L. R Williams in „Staining nucleic acids and proteins in electrophoresis gels“, Biotech. Histochem. (2001) 76(3), Seiten 127-132]. Schon vor einer für eine Substanz spezifischen Anfärbung müssen die Proben im allgemeinen mit einem Fixiermittel am Gel fixiert werden, um ein "Ausbluten" während der Anfärbreaktion in den Lösungen zum Anfärben und Entfärben zu vermeiden, was bereits unerwünschte Veränderungen hervorrufen kann.

Bekannte Methoden zum Sichtbarmachen von Proteinen sind das Färben mit Amido black [C. M. Wilson, Anal. Biochem. 6, Seiten 263 bis 278 (1979)] oder mit Comassie Blue Farbstoff [S. Fazekas de St. Groth et al., Biochim. Biophys. Acta 1, Seiten 377-391 (1963)], bei denen aber die geringe Empfindlichkeit als besonderer Nachteil empfunden wird. Ein Vorteil ist aber die quantitative Reaktion der verschiedenen Polypeptide mit Farbstoffen.

Eine in der Proteinanalyse genügend empfindliche Methode ist das Abscheiden und Binden von Silberionen an Proteine [B. R. Oakly et al., Anal. Biochem. 105, Seiten 361-363 (1980)], (Silverstaining), bei der jedoch der geringe dynamische Bereich und Störungen der weiteren

Untersuchungen besonders ins Gewicht fallen. Ein weiterer Nachteil dieser Anfärbemethode ist, dass bei der Färbung eine Diskriminierung zwischen verschiedenen Proteinen erfolgt, also einige Proteine stark und andere Proteine weniger stark anfärben. In unbekannten Proteinproben ist ein Abschätzen der relativen Menge beziehungsweise Häufigkeit der verschiedenen Proteine nicht möglich, was aber im Forschungsgebiet von Zelluntersuchungen (Proteomics) eine der Grundvoraussetzungen ist.

D. Kazmin et al. schlagen in einer neueren Publikation vor [Analytical Biochemistry 301, Seiten 91 bis 96 (2002)], Tryptophan enthaltende Proteine unter UV-Licht mit Trichloressigsäure oder Chloroform zu behandeln, und die Regionen der getrennten Proteine in einem Polyacrylamidgel mittels der angeregten sichtbaren Fluoreszenzstrahlung (natürliche Fluoreszenz des modifizierten Tryptophans) sichtbar zu machen. Das Spektrum der nativen Fluoreszenz wird somit vom UV-Bereich in den sichtbaren Bereich verschoben.

Eine weitere bekannte Methode ist das Anfärben mit im sichtbaren Bereich fluoreszierenden Farbstoffen nach der elektrophoretischen Trennung. Ein Vorteil ist die hohe Linearität der Abhängigkeit der gemessenen Intensität von der Menge (dynamischer Bereich). Besonders nachteilig ist aber, dass die Behandlung mit Chemikalien zum Auswaschen niedermolekularer Substanzen führen kann, die nicht erfasst werden. Ferner kann die Veränderung von Substanzen bei der Einwirkung der Chemikalien nicht ausgeschlossen und daher eine quantitative Reaktion aller Substanzen einer Probe nicht gewährleistet werden.

Ähnliche oder gleiche Nachteile bestehen, wenn die Substanzen vor der Trennung mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt werden, wobei der Farbstoff kovalent gebunden wird. Dies ist ein gängiges Verfahren für die Analyse von Proteinen, da eine hochempfindliche, quantitative Detektion gewährleistet wird. Der grosse Nachteil dieser Technik ist aber, dass die Substanzen in den Analyseproben chemisch verändert werden (auch Masse sowie isoelektrischer Punkt) und nur für spezifische Farbstoffe entwickelte spezielle Systeme zur Detektion verwendet werden können. Das Verfahren ist daher unwirtschaftlich. Ferner kann die Anwesenheit fluoreszierender Farbstoffe weitere Untersuchungen stören, zum Beispiel massenspektrometrische Messungen.

Färbemittel werden im allgemeinen vor einer massenspektrometrischen Messung, vor einer enzymatischen Verdauung oder vor dem Blotten wieder entfernt, was wiederum Veränderungen der getrennten Substanzen verursachen kann. Glykolisierte Proteine sind in diesem

Zusammenhang besonders empfindlich und können oft nicht erfasst werden. Die zusätzlichen Arbeitsschritte sind zudem zeitaufwendig und verursachen Chemikalienabfall, der entsorgt werden muss. Um so bedingte Unsicherheiten bei einer Messung zu umgehen, werden häufig zwei bis 4 Gelplatten, je 2 als Mess- und Referenzplatte verwendet, um aus den Referenzplatten die Substanzen für weitere Messungen zu isolieren. Dieser hohe Materialverbrauch wird als besonderer Nachteil empfunden.

H. Yamamoto et al. beschreiben in *Analytical Biochemistry* 191, Seiten 58-64 (1990) ein densitometrisches Verfahren zur bildhaften Darstellung nicht markierter, getrennter Substanzen bei der 2-D Gelelektrophorese, bei dem die Absorptionsspektren der Substanzbereiche im UV-Bereich bis in den sichtbaren Bereich durch Selektion geeigneter Wellenlängen aufgenommen werden. Die Methode ist nicht ausreichend empfindlich und eignet sich besonders nicht für die in neuerer Zeit entstandenen Anforderungen an die Untersuchung von Proteinen (Proteomics).

Bislang ist noch kein Verfahren zur direkten Bestimmung von elektrophoretisch trennbaren Substanzen mittels 1D- oder 2D-Flachbettelektrophorese (abgekürzt als PAGE bei Verwendung von Polyacrylamidgelen) ohne Vorbehandlung und Modifikation der Substanzen bekannt geworden, insbesondere bei der Bestimmung und dem Sichtbarmachen von Proteinen in Acrylamidgelen oder anderen Festgelen (die meist quervernetzt sind). Ein solches Verfahren ist äusserst wünschenswert, um die genannten Nachteile, zum Beispiel geringe Empfindlichkeit, Fixieren, Entfärben, Markieren, unterschiedliche Stärke der Färbung für verschiedene Substanzen (Proteine), Verändern der Substanzen (Proteine) durch kovalent gebundenen Farbstoff, zu vermeiden.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass die direkte Messung und/oder bildhafte Darstellung bei der 1D- oder 2D-Flachbettelektrophorese und der Flachbettchromatographie (Dünnschichtchromatographie) dann möglich ist, wenn man die Eigenfluoreszenz im UV-Bereich von elektrophoretisch trennbaren Substanzen mit UV-Strahlung anregt und misst. Der dynamische Bereich ist unerwartet hoch und es können auch glykolisierte Proteine mit der Messung direkt erfasst werden. Ferner ist die Messempfindlichkeit überraschend hoch, so dass sogar ein Nachweis im Bereich von 1 bis 5 Nanogramm pro Bande ermöglicht wird. Die direkte Messung eignet sich daher besonders für die Detektion geringer Substanzmengen, zum Beispiel Zelllysate.

Ein erster Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung mit den Komponenten:

- a) einer UV-Quelle (1) für Anregungslicht im Wellenlängenbereich von 140 bis 320 nm;
- b) einem Trennmedium (2) von einer flachbettelektrophoretischen Trennung elektrisch geladener Substanzen, oder einem Trennmedium (2) einer flachbettchromatographischen Trennung elektrisch geladener oder neutraler Substanzen;
- c) im Trennmedium (2) verteilten Bereichen von zu trennenden und getrennten sowie nicht markierten Substanzen, die bei Anregung mit besagter UV-Quelle (1) UV-Fluoreszenz im Wellenlängenbereich von 150 bis 400 nm emittieren;
- d) einem UV-Detektor (3) für die UV-Fluoreszenzstrahlung; und
- e) optischen oder optoelektronischen Komponenten für das Filtern, die Führung und/oder Verstärkung der Anregungs- und Fluoreszenzstrahlung.

Bei der UV-Quelle (1) kann es sich um Laser oder UV-Lampen, zum Beispiel Quecksilberdampflampen, KrF-Lampen, Xe-Blitzlichtlampen, Excimer-Gas-Emission-Lampen (e-lamp, Firma TuiLaser) oder Laser zur Ein- oder Mehrphotonenanregung handeln. Bei der Verwendung von Lampen kann die gewünschte Wellenlänge durch Vorschalten von optischen Filtern, Gittern oder anderen optischen Elementen eingestellt und zur Erzeugung einer ausreichenden Energiedichte mit Linsen fokussiert werden. Bei den Lasern kann es sich um kontinuierliche oder gepulste Laser mit Pulslängen im Bereich von Femto- bis Millisekunden handeln. UV-Laser sind häufig Frequenz vervielfachte Laser, die Strahlung im sichtbaren Bereich generieren. Die Strahlung kann direkt, fokussiert oder als aufgeweiteter Strahl sowie durch Mehrfachbelichtung auf das Gel gerichtet werden. Die Leistungs- und Energiedichte wird so gewählt, dass ein messbares Fluoreszenzsignal erzeugt wird, ohne dabei die Substanzen nennenswert zu schädigen. Die Energiedichte kann zum Beispiel 0,1 bis 3500, bevorzugt 1 bis 500, und besonders bevorzugt 1 bis 50 mJ/cm² in einer Sekunde betragen. Besonders geeignet sind bei der Messung von Proteinen um 35 mW/cm² in einer Sekunde. Solche UV-Lichtquellen sind kommerziell erhältlich. Als besonders geeignet hat sich ein Laser der Firma Spectra Physics (Modell Tsunami) erwiesen, der bei einer Wellenlänge von 280 nm (Frequenz von 840 nm), 80 MHz und 100 Femtosekunden Pulslänge arbeitet, und eine Ausgangsleistung von 150 mW hat. Ebenfalls als besonders geeignet hat sich ein frequenzvervielfachtes Nd:YAG Lasersystem (266 nm Wellenlänge, 500 ps Pulslänge, 4 mW Ausgangsleistung) von JDS Uniphase erwiesen.

Die Wellenlänge des UV-Anregungslichts beträgt bevorzugt 140 bis 320 und besonders bevorzugt 220 bis 300 nm.

Das Trennmedium (2) kann aus unterschiedlichen flächenförmigen Materialien bestehen. Sie dürfen im verwendeten Laufmittel nicht löslich und sie müssen dielektrisch sein. Es kann sich um anorganische Materialien handeln, zum Beispiel Metalloxide und Salze wie Silikate. Einige Beispiele sind Aluminiumoxid, Titanoxid, Silicagele und Kieselgur. Weitere geeignete Materialien sind Papiere und Cellulosen. Besonders geeignete Materialien sind gegebenenfalls vernetzte, gelbildende Polymere, wie zum Beispiel Polyacrylamidgele, Agarosegele und Dextrangele.

Das Trennmedium kann für die Trennung und/oder zur anschliessenden Messung auf einem dielektrischen oder elektrisch leitenden Träger aufgebracht sein, zum Glas, Quarz oder Kunststoffen, Metalloxiden und Metallen. Besonders geeignet sind hierfür Materialien, die UV-Strahlung reflektieren, zum Beispiel polierte Metallplatten oder mit Metallen beschichtete Kunststoffplatten.

Trennmedien für die elektrophoretische Trennung sind vielfach bekannt, in der Literatur beschrieben und kommerziell erhältlich. Sie werden daher hier nicht näher beschrieben. Es sei aber erwähnt, dass für das wichtige Gebiet der Trennung von Proteinen hauptsächlich Gele auf Basis von Polyacrylamiden eingesetzt werden. Die Trennmedien weisen vorteilhaft eine geringe UV-Absorption und UV-Fluoreszenz auf, um eine hohe Messempfindlichkeit erzielen zu können.

Das elektrophoretische Trennmedium kann in der erfindungsgemässen Anordnung auch durch Trennmedien für die Flachbett- beziehungsweise Dünnschichtchromatographie ersetzt werden, wobei diese Trennmedien ebenfalls vorteilhaft eine geringe UV-Absorption und UV-Fluoreszenz aufweisen. Das chromatographische Trennmedium kann aus unterschiedlichen flächenförmigen Materialien bestehen, die Moleküle mit Eigenfluoreszenz im UV-Bereich bei Anregung mit UV-Strahlung zum Beispiel durch unterschiedliche Absorption und/oder nach unterschiedlicher Grösse zu trennen vermögen. Sie dürfen im verwendeten Laufmittel nicht löslich sein und sind gegebenenfalls als Trennschicht auf einem Träger aufgebracht. Es kann sich um feinteilige anorganische Materialien handeln, zum Beispiel Metalloxide und Salze wie Silikate. Einige Beispiele sind Aluminiumoxid, Titanoxid, Silicagele und Kieselgur. Weitere geeignete Materialien sind Papiere und Cellulosen. Besonders geeignete Materialien sind gegebenenfalls vernetzte, gelbildende Polymere, wie zum Beispiel Polyacrylamidgele, Agarosegele und Dextrangele, die auch als feinteilige Materialien eine Schicht auf einem

Träger bilden können. Die Flachbettchromatographie kann sowohl für elektrisch geladene als auch ungeladene Substanzen eingesetzt werden.

Die Trennmedien können zur Erzielung möglichst planer Oberflächen und zum Schutz vor Austrocknung und Alterung mit einer Abdeckung versehen werden, die sowohl für das Anregungslicht als auch das Fluoreszenzlicht optisch transparent ist, da die Bestrahlung auf das Gel gerichtet wird und die Messung der Fluoreszenzstrahlung vorteilhaft durch die Abdeckung vorgenommen wird. Für UV-Strahlung durchlässige Materialien sind bekannt. Es kann sich um Kunststoffe handeln, die zweckmässig als Folien ausgebildet sind. Sehr gut eignet sich auch Quarzglas.

Die Substanzen können im Trennmedium in ein- oder zweidimensionaler Richtung verteilt sein. Die Substanzen sind nicht chemisch für eine Detektion modifiziert. Sie müssen zur Emission von UV-Licht anregbar sein. Solche Substanzen enthalten zum Beispiel aromatische oder heteroaromatische Reste und/oder gegebenenfalls konjugierte ungesättigte Kohlenstoff- oder Kohlenstoff-Heteroatom-Doppelbindungen oder Stickstoffmehrfachbindungen. Die Heteroatome können ausgewählt sein aus der Gruppe O, N, S und P. Ferner enthalten die Substanzen elektrisch geladene Gruppen, zum Beispiel saure Gruppen (zum Beispiel Carboxyl-, Phosphor- oder Phosphonsäure-, Bor- oder Boronsäure-, und/oder Schwefel- oder Sulfonsäuregruppen) und/oder basische Oniumgruppen (zum Beispiel Ammoniumgruppen).

Die Trennmedien können unmittelbar nach einer Trennoperation vermessen werden oder es kann sich um gelagerte Proben handeln. Vor einer Lagerung werden Substanzbereiche in den Trennmedien in an sich bekannter Weise fixiert, bei Gelen zur Proteintrennung zum Beispiel durch Behandeln mit Alkoholen wie Methanol oder Ethanol.

Die Wellenlänge der Fluoreszenzstrahlung beträgt bevorzugt von 150 bis 400 und besonders bevorzugt von 230 bis 400 nm.

Das Messprinzip wird mit Proteinen als Substanz erläutert. Proteine können die Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und/oder Tyrosin enthalten, bei denen das Emissionsmaximum bei Wellenlängen von 282 nm, 303 nm, beziehungsweise 348 nm liegt. Der Extinktionskoeffizient ist im Wellenlängenbereich von 200 bis 320 nm hoch und Proteine eignen sich daher besonders für das erfindungsgemässe Messprinzip. Viele organische Substan-

zen mit den zuvor erwähnten Strukturelementen weisen ähnliche Eigenschaften auf und sind einer Messung mit der erfindungsgemässen Vorrichtung zugänglich, wie zum Beispiel auch Genmaterial (DNA oder RNA), die elektrophoretisch trennbar sind.

Bei dem UV-Detektor (3) kann es sich um Photodetektoren zur Messung der Fluoreszenzintensität handeln, die vielfach kommerziell erhältlich sind. Geeignete Detektoren sind zum Beispiel Photomultiplier, Photodioden (Halbleiterdioden oder Halbleiterdiodenanordnungen beziehungsweise -arrays) und UV-empfindliche CCD-Kameras. CCD-Kameras (elektronische Kameras mit digitaler Bildaufzeichnung und Wiedergabe) sind bevorzugt. UV-empfindliche CCD-Kameras werden zum Beispiel von der Firma Andor (USA) angeboten.

Bei der Komponente (d) kann es sich um optische Filter zur Ausblendung unerwünschter Hintergrund- und/oder Streustrahlung handeln, die im Strahlengang zwischen der Platte (3) und dem UV-Detektor angeordnet werden. Optische Filter können auch verwendet werden, um die Wellenlänge des Anregungslichts einzustellen und von der UV-Lichtquelle ausgehende unerwünschte Strahlung auszublenden. Bei den Komponenten kann es auch um Spiegel, Prismen oder diffraktive Elemente zur Ablenkung oder dem Sammeln von Anregungslicht handeln. Ferner sind Linsen- oder Linsensysteme zweckmässig, mit denen Strahlung geführt oder fokussiert wird. Sphärische Linsen können zur Aufweitung eines Laserstrahles eingesetzt werden. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit können auch Lichtverstärker (Restlichtverstärker) eingesetzt werden. Zwischen UV-Lichtquelle und der Platte (3) können auch Abblendelemente angeordnet sein, die eine Bestrahlung in definierten Zeitintervallen erlauben.

Figur 1 zeigt eine Ausführungsform einer erfindungsgemässen Vorrichtung. Der Laserstrahl (4) eines UV-Lasers (1) wird durch eine Konvexlinse (5) aufgeweitet und auf eine Abdeckung (6) des Trennmediums (2) gerichtet. Die Abdeckung schützt eine Schicht Acrylamidgel (7), die auf einer rostfreien und polierten Stahlplatte (8) aufgebracht ist. Im Acrylamidgel befinden sich über die Fläche verteilte Bereiche getrennter Substanzen, die bei Bestrahlung UV-Fluoreszenz (9) erzeugen. Die Fluoreszenzstrahlung (9) wird über sphärische Linsen (10) und (11), zwischen denen ein Bandpassfilter (12) zum Beispiel für den Wellenlängenbereich 300-375 nm angeordnet ist, zu einem UV-Detektor (3) geführt, zum Beispiel einer UV-empfindlichen CCD Kamera.

Die erfindungsgemässe Anordnung eignet sich hervorragend zur direkten Messung von Substanzen im Trennmedium (zum Beispiel ein Gel) einer Platte für die 1D- oder 2D-Gelelektrophorese oder Trennmedien für die Flachbettchromatographie, ohne dass die Substanzen vor oder nach der Trennung markiert werden müssen. Die nicht getrennten oder getrennten Substanzen (Analyten) können sogar in einfacher Weise mittels Blotten (Einwirkung eines elektrischen Feldes senkrecht zur Ebene des Trennmediums) direkt auf eine aufgelegte Membran transferiert und mit der erfindungsgemässen Anordnung direkt unter Verwendung unmarkierter Antikörper gemessen werden. Die Methode bietet gegenüber benutzten Standardverfahren erhebliche Vorteile:

- a) die Verwendung von Chemikalien zur Messung/Sichtbarmachung wird vollständig vermieden;
- b) der Zeitaufwand für die Messung wird erheblich reduziert;
- c) die Veränderung von Substanzen durch die Modifikation mit Chemikalien und ein Auswaschen von Substanzen durch das Modifikationsverfahren wird vollständig vermieden;
- d) die chemische Nachbehandlung für weitere Untersuchungen, zum Beispiel mittels Massenspektroskopie, wird vermieden;
- e) Vermeidung einer präparativen Trennung gegenüber Standardverfahren, bei denen eine analytische und parallel eine präparative Trennung durchgeführt werden, um unmodifizierte Substanzen für weitere Untersuchungen bereitzustellen;
- f) Erfassung aller Substanzen einer zu trennenden Mischung, bei Proteinmischungen zum Beispiel auch Glykoproteine;
- g) sehr hohe Empfindlichkeit, vergleichbar mit der Silbermarkierung, und zusätzlich ein hoher dynamischer Bereich wie beim Markieren mit Farbstoffen und Fluorophoren;
- h) Messung von nicht mit Farbstoffen/Fluorophoren modifizierbaren Substanzen;
- i) keine signifikante Zersetzung von Proteinen durch UV-Bestrahlung bis mindestens 35 mJ/cm², was mittels Massenspektroskopie von bekannten Proteinen nachweisbar ist;
- j) keine zusätzliche Verwendung von Trennmedien als Referenzmaterial.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung von mittels 1D- oder 2D-Flachbettelektrophorese getrennten Substanzen, bei dem nicht getrennte und getrennte Substanzen im Trennmedium für elektrophoretische Trennungen mit einer Lichtquelle bestrahlt werden, und emittiertes Fluoreszenzlicht mit einem Detektor gemessen wird, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man (a) bei Einwirkung von UV-Licht im UV-Bereich Fluoreszenz emittierende Substanzen (b) im Trennmedium direkt mit UV-Licht einer Wellenlänge

von 140 bis 320 nm bestrahlt und (c) die UV-Fluoreszenz bei Wellenlängen von 150 bis 400 nm mit einem UV-empfindlichen Detektor misst. Das Verfahren kann auch für Trennmedien der Flachbettchromatographie eingesetzt werden, bei der die Trennung elektrisch geladener oder ungeladener Substanzen möglich ist.

Für das Verfahren gelten die zuvor für die Vorrichtung beschriebenen Ausführungsformen und Bevorzugungen.

Die Erzeugung des digitalen Bildes von der Probe kann auf verschiedenen Arten erfolgen:

- 1) Die gesamte Fläche wird gleichzeitig zur Fluoreszenz angeregt und eine digitale Kamera nimmt ein Bild vom gesamten Trennmedium auf.
- 2) Die Probe wird Abschnittsweise vermessen und die einzelnen Elemente werden im Computer zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Dabei kann ein Abschnitt beliebig klein sein (begrenzt durch den Laserfokus von ca. 200 nm) oder beliebig groß (wie 1). Ein Abschnitt kann wieder ein Bild sein (z.B. mehrere Spots enthalten) oder nur ein Punkt des späteren Bildes (Prinzip des Scanners). Je kleiner der Abschnitt gewählt wird desto effektiver lässt sich das Fluoreszenzlicht sammeln. Erhöhte Sammeleffizienz verkürzt die Messzeit, verringert potentielle UV-Schäden an den gemessenen Substanzen und verbessert die Empfindlichkeit der Aparatur. Um die gesamte Probe nach den Scannerprinzip zu vermessen kann die a) Probe selbst bewegt werden, b) der Detektor bewegt werden, c) die Anregungsquelle bewegt werden, d) das Anregungs- und Emissionslicht umgelenkt werden, oder Kombinationen von a) - d) verwendet werden. Wird nur ein Punkt oder eine Linie angeregt, kann durch konfokale Detektion die Untergrundfluoreszenz (z.B. der Abdeckung und/oder Probenhalterung) stark reduziert werden.

Die Probe oder Abschnitte der Probe können mehrfach vermessen werden, um eine bessere Nachweisgrenze zu erhalten.

Für das erfindungsgemässe Verfahren werden vorteilhaft UV-Laser verwendet, die über das Prinzip einer Frequenzvervielfachung für verschiedene Wellenlängen kommerziell erhältlich sind. Es kann sich um kontinuierliche oder gepulste Laser handeln. Gepulste Laser sind besonders geeignet, wobei Laser mit unterschiedlichen Pulslängen bekannt sind, die im Bereich von Mikro- bis Femtosekunden liegen können. Kurze Pulslängen im Femtosekundenbereich sind besonders vorteilhaft, da die angeregte Fluoreszenzstrahlung eine Lebensdauer hat, die im wesentlichen zwischen den einzelnen Pulsen liegt, so dass nur wenig oder

keine Anregungsstrahlung auf den UV-Detektor fällt. Die Anregungsstrahlung wird vorteilhaft in einem Winkel von kleiner als 90° zur Senkrechten der Platte (3) eingestrahlt.

Die Messung kann in verschiedenen Varianten vorgenommen werden. Grundsätzlich kann das Anregungslicht so aufgeweitet werden, dass das gesamte Trennmedium belichtet wird, was zum Beispiel bei nicht zu grosser Kantenlänge möglich ist. Die Platte kann einmal oder mehrmals belichtet werden, um eine ausreichende Fluoreszenzstrahlung für die Messung zu erzielen.

Das Verfahren ist sehr variabel. Insbesondere können die Bedingungen so eingestellt werden, dass photoempfindliche Substanzen geschont und eine Zersetzung weitgehend unterdrückt werden kann. Das Verfahren eignet sich auch für eine Automatisierung und Standardisierung, was für eine industrielle Anwendung besonders wertvoll ist.

Wenn als UV-Detektor ein UV-Spektrometer verwendet wird, können die Substanzbereiche auch spektrometrisch zum Beispiel über einen Wellenlängenbereich von 180 bis 400 nm bestimmt werden. Auf diesem Wege können auch spezifische Substanzen an Hand charakteristischer Wellenlängen der Fluoreszenzstrahlung direkt auf dem Trennmedium, oder nach Bestimmung der getrennten Substanzbereiche mit UV-Detektoren, identifiziert werden.

Für die Entnahme der Substanzbereiche zu weiteren Untersuchungen wie zum Beispiel Massenspektrometrie (MALDI-MS) und anderen Methoden muss beachtet werden, dass die Substanzen farblos, daher unsichtbar, und mit blossen Auge nicht erkennbar sind. Eine Möglichkeit zur Entnahme besteht in der Herstellung eines transparenten Negativfilmes auf zum Beispiel Kunststoffolien, den man zur Indizierung der Substanzbereiche auf der Oberfläche des Trennmediums (Gels) auflegen kann. Eine andere Möglichkeit besteht in der automatisierten Entnahme über ein geeignetes Rechenprogramm, das digitale Aufzeichnungen auswertet und eine mechanische Vorrichtung zur Probenentnahme steuert. Eine weitere Möglichkeit ist zum Beispiel die Substanzbereiche mit einem sichtbaren Laser (Laserpointer) für die manuelle Entnahme anzuzeigen.

Das erfindungsgemässe Verfahren kann in allen Bereichen angewendet werden, in denen Trennungen und Untersuchungen von Substanzen mittels Gelelektrophorese oder Flachbettchromatographie vorgenommen werden. Ein wichtiger Bereich ist die biochemische Forschung zur Untersuchung von Körperflüssigkeiten, oder entsprechenden Extrakten und Kon-

zentraten. Die Untersuchung von Proteinen spielt hier eine besonders grosse Rolle (Proteomics). Das Verfahren kann für diagnostische Untersuchungen eingesetzt werden, bei denen das Vorhandensein von spezifischen Substanzen auf bestimmte Krankheiten schliessen lässt. Ferner kann die Verteilung und der Abbau (Metabolismus) von pharmazeutischen Wirkstoffen und Pestiziden in Körperflüssigkeiten von Pflanzen und Tieren einschliesslich Warmblütern mit dem erfindungsgemässen Verfahren untersucht werden. Das Verfahren kann auch zur Charakterisierung und/oder Bestimmung der Wirkung von Wirkstoffen (Bindung von Wirkstoffen an getrennte Proteine oder Nukleotidsequenzen) und zur Qualitätskontrolle von Wirkstoffen dienen. Das Verfahren kann ferner zur weiteren Untersuchung von Proteinen auf Trennmedien dienen, insbesondere zur Analytik von Westernblots oder ähnlichen Verfahren, bei denen getrennte Substanzbereiche vom Trennmedium auf Membranen übertragen und anschliessend mittels Zugabe von mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörpern bestimmt werden. Ein besonderer Vorteil des Verfahrens besteht in der Detektion unmarkierter Antikörper durch Anregung und Messung deren Eigenfluoreszenz im UV-Bereich gemäss dem Verfahren der Erfindung (die Membran entspricht in diesem Fall dem Trennmedium).

Das Verfahren ist sehr empfindlich und erlaubt die Messung von Mengen selbst bis zu 1 bis 5 Nanogramm. Es ist daher besonders für die Untersuchung kleinster Substanzmengen geeignet.

Für diagnostische Untersuchungen wird das Verfahren zweckmässig automatisiert und bezüglich Probenaufbereitung, Trenn- und Messbedingungen und Auswertung nach der Trennung so standardisiert, dass die Bestimmung einer oder weniger krankheitsspezifischer Substanzen einen sicheren Hinweis für eine anschliessende ärztliche Behandlung geben. Diagnostische Untersuchungen werden mit dem menschlichen oder tierischen Körper oder Pflanzen entnommenen Proben, wie zum Beispiel Körperflüssigkeiten (Blut, Urin, Blutplasma, Magen- oder Darmsaft, Pflanzensäfte), oder Gewebeprobe durchgeführt, die vor der Trennung gegebenenfalls aufbereitet (Reinigung und Konzentrierung, chemische Vorbehandlung oder Herstellung von Zellysaten) werden.

Die Flachbettelektrophorese beziehungsweise -chromatographie wird in breitem Umfang in der Analytik und ganz besonders in der Freigabeanalytik eingesetzt. Mit der erfindungsgemässen Vorrichtung beziehungsweise dem erfindungsgemässen Verfahren kann gerade in

diesem Anwendungsbereich die Wirtschaftlichkeit auf Grund der Vereinfachung im Verfahrensablauf und der Vermeidung von Chemikalienabfällen besonders erhöht werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung der erfindungsgemässen Vorrichtung oder die Anwendung des erfindungsgemässen Verfahrens zur Trennung und Bestimmung krankheitsspezifischer Substanzen in dem menschlichen oder tierischen Körper oder Pflanzen entnommenen Proben.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

Beispiel 1: Trennung der Proteine eines Zellextraktes.

Der experimentelle Aufbau entspricht dem in Figur 1 dargestellten Aufbau. Als UV-Lichtquelle wird ein UV-Laser der Firma Spectra Physics verwendet (Tsunami®, 840 nm, 80 MHz, 100 fs Pulslänge, Frequenzverdreifung zu 280 nm Anregungslicht, Ausgangsleistung 150 mW). Zwischen Konvexlinse (5) und dem Trennmedium (2) befindet sich eine Blende, mit der eine quadratische Bestrahlungsfläche von 1 cm Kantenlänge eingestellt wird. Die Energiedichte an der Oberfläche des Trennmediums (2) beträgt 40 mW/cm². Die Belichtungszeit beträgt 1 Sekunde. Als UV-Detektor wird eine käufliche UV-sensitive BCCD Kamera der Firma LaVision Biotec Deutschland (QE>65%) eingesetzt. Die 1 cm² grosse Fläche wird über 2 UV-Linsen der Firma Nikon (105 mm, f = 4,5) abgebildet und im Computer zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Zwischen den beiden Linsen befindet sich ein UV-Bandpassfilter für den Wellenlängenbereich von 300 bis 375 nm. Für das gewählte Format von 8 x 7 cm (Mini-Gel, nach Aufquellen in dreifach destilliertem Wasser etwa 20% größer als bei der Trennung) werden insgesamt 56 Bilder aufgenommen. Hierzu wird das Trennmedium manuell in einem Raster mit Abstand 1 cm in einem Positionierungstisch bewegt.

Das Trennmedium (2) ist als 1 mm dicke Schicht eines käuflichen Polyacrylamidgels auf einer rostfreien Stahlplatte (8) aufgebracht, Das Polyacrylamidgel ist mit einer 1 mm dicken Quarzplatte (6) abgedeckt.

Die Trennung mittels 2-D Gelelektrophorese wird nach Klose, J. *Methods Mol Biol* 1999, 112, 147-172 als Kombination von isoelektrischer Fokussierung (IEF) mit Trägerampholyten (erste Dimension) und SDS-PAGE (zweite Dimension) durchgeführt.

Die IEF wird in gelgefüllten Glasstangen durchgeführt (Durchmesser 0,9 mm, 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 3,5% Acrylamid, 0,3% Piperazindiacrylamide und eine Gesamtmenge von 4% Trägerampholyt pH 2-11). Die Proteine stammen von Zelllysaten der Zellen EA.hy 926 [Edgell, C, J. S. Proc Natl Acad Sci USA 1983, 80, 3734-3737]. Es werden etwa 10 µg Protein an der anodischen Seite der IEF Gele von 7 Zentimeter Länge aufgebracht und unter Bedingungen einer nicht im Gleichgewicht pH Gradient Elektrophorese (non equilibrium pH gradient electrophoresis; NEPHGE) für Vh 1842 fokussiert. SDS-PAGE wird in 15% Acrylamid Gel mit den IEF Gelen als Stapelgel durchgeführt. Die Gelgröße beträgt 70x60x1 Millimeter.

Nach der Trennung werden die Proteine über Nacht im Gel fixiert (10% Essigsäure, 50% Ethylalkohol und 40% dreifach destilliertes Wasser). Vor der Messung wird ein Gel für 45 min in 50ml dreifach destilliertem Wasser gewaschen (zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz), auf die Stahlplatte gelegt und mit einem Quarzglasplatte abgedeckt.

Mit der Kamera wird ein Bild der UV-Floureszenz aufgenommen; dunkle Spots entstehen durch Fehlfarbandarstellung in der Bildverarbeitung. Die Darstellung dient dem besseren Vergleich mit der Standardmethode „Silberfärbung“, bei der die getrennten Proteine als schwarze Flecken dargestellt werden. Das erhaltene Bild ist vergleichbar mit einer mittels Silberionen sichtbar gemachten Trennung.

Beispiel 2: Bestimmung der Empfindlichkeit

Es wird die Anordnung gemäss Beispiel 1 verwendet. Es werden 1D-Gelplatten von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland, NOVEX 12 % Tris-Glycin Gel 12 oder 10 well 1mm Dicke Nr. EC60052 bzw. EC6005) (mit Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts beladen und getrennt (Lysozyme, (14,6 kDa, Huhn), Rinder Anhydrase (29 kDa), GAPDH (Kaninchen, 36 kDa), BSA (Rinder, 66 kDa) und Phosphorylase (Kaninchen, 97,4 kDa). Die Proteine werden in gleichen Mengen gemischt und in SDS Puffer (NOVEX Tris-Glycine SDS denaturierender Proben Puffer LC2676) so verdünnt, dass nach Auftragen auf das Gel 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5 und 1 ng je Bande (je Protein) vorliegen. Die Trennung erfolgt nach [Laemmli U.K., 1970, Nature 227:680-685] Laufmittel Puffer: NOVEX Tris-Glycine SDS Running Buffer LC2675), Einwandern der Probe bei konstant 50 V für 10 Minuten, anschließend so lange (etwa 1,5 Stunden) laufen lassen (bei konst 145 V), bis die Lauffront (Bromphenolblau, im Proben Puffer enthalten) das untere Ende der Gele erreicht hat.

Nach der Trennung werden die Proteine im Gel wie in Beispiel 1 fixiert und vor der Messung wird ein Gel für 45 Minuten in 50ml dreifach destilliertem Wasser gewaschen, auf die Stahlplatte gelegt und mit einer Quarzglasplatte abgedeckt.

Nach der Trennung werden die getrennten Bereiche gemäss der Durchführung in Beispiel 1, sowie nach den Verfahren der Silbermarkierung und Anfärbung mit Comassie Blue sichtbar gemacht und verglichen. Die Empfindlichkeit gemäss Durchführung nach Beispiel 1 liegt bei 1 bis 5 ng Nachweisgrenze, vergleichbar mit dem Verfahren der Silbermarkierung. Bei dem Verfahren mit Comassie Blue liegt die Nachweisgrenze bei 10 bis 50 ng.

Beispiel 3: Verwendung eines 266nm Lasersystems

Der experimentelle Aufbau entspricht dem in Figur 1 dargestellten und in Beispiel 1 beschriebenen Aufbau. Als UV-Lichtquelle wird jedoch ein UV-Lasersystem der Firma JDS Uniphase (frequenzvervierfacher Nd:YAG, 266 nm Wellenlänge, 500 ps Pulslänge, 4 mW Ausgangsleistung) verwendet. Als Trennsystem werden die Gele gemäss Beispiel 2 verwendet. Es wird gezeigt, dass die Verwendung des erheblich kostengünstigeren Lasersystems qualitativ und quantitativ keinen Unterschied zu den in den Beispielen 1 und 2 beschriebenen Resultaten ergibt. Allerdings muss bedingt durch die geringere Leistung entsprechend länger (30 fach) belichtet werden.

Beispiel 4: Blottingverfahren mit Nitrozellulose Membran

Es wird gezeigt, dass mit dem in Figur 1 dargestellten und mit dem in Beispiel 3 beschriebenen Aufbau und Trennung auch die quantitative Detektion von Proteinen (polyclonales rabbit-IgG-Antikörperfragment), von der Firma Sigma Aldrich, Produktnummer I-5006) nach dem Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran und nach der Markierung mit unmarkierten Antikörperfragmenten (anti-rabbit-IgG-Antikörperfragmente, Firma Sigma Aldrich, Produktnummer R-9130) bei einem Spotdurchmesser von 500 Mikrometern, mit der Konzentration von 1 ng/Spot, und sogar mit noch geringeren Konzentrationen möglich ist. Dies erweitert die Anwendungsmöglichkeiten zum Beispiel in Blottingverfahren.

Patentansprüche:

1. Vorrichtung mit den Komponenten:

- a) einer UV-Quelle (1) für Anregungslicht im Wellenlängenbereich von 140 bis 320 nm;
- b) einem Trennmedium (2) von einer flachbettelektrophoretischen Trennung elektrisch geladener Substanzen, oder einem Trennmedium (2) einer flachbettchromatographischen Trennung elektrisch geladener oder neutraler Substanzen;
- c) im Trennmedium (2) verteilten Bereichen von nicht getrennten und getrennten sowie nicht markierten Substanzen, die bei Anregung mit besagter UV-Quelle (1) UV-Fluoreszenz im Wellenlängenbereich von 150 bis 400 nm emittieren;
- d) einem UV-Detektor (3) für die UV-Fluoreszenzstrahlung; und
- e) optischen oder optoelektronischen Komponenten zum Filtern, Führen und/oder Verstärken der Anregungs- und Fluoreszenzstrahlung.

2. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der UV-Quelle um einen Laser, UV-Lampen oder Laser zur Mehrphotonenanregung.

3. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die UV-Quelle eine Energiedichte von 0,1 bis 3500 mJ pro cm² aufweist, gemessen an der Oberfläche des Trennmediums.

4. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Wellenlänge des Anregungslichts 140 bis 320 nm beträgt.

5. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Trennmedium um Metalloxide, Salze, Papiere, Cellulosen oder vernetzte, gelbildende Polymere handelt.

6. Vorrichtung gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den gelbildenden Polymeren um Polyacrylamide, Agarose oder Dextran handelt.

7. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Trennmedium (2) ein in der Flachbettchromatographie (Dünnschichtchromatographie) verwendetes Trennmedium ist.

8. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Trennmedium auf einem Träger aufgebracht und gegebenenfalls mit einer UV-durchlässigen Abdeckung versehen ist.
9. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen der Komponente c) aromatische oder heteroaromatische Reste und/oder gegebenenfalls konjugierte ungesättigte Kohlenstoff- und/oder Kohlenstoff-Heteroatom-Doppelbindungen und/oder Stickstoffmehrfachbindungen und elektrisch geladene Gruppen enthalten.
10. Vorrichtung gemäss Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Substanzen um Proteine handelt.
11. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die UV-Fluoreszenz 150 bis 400 nm beträgt.
12. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem UV-Detektor um eine CCD Kamera, einen Photomultiplier, eine Halbleiterdiode oder eine Halbleiterdiodenanordnung handelt.
13. Verfahren zur Bestimmung von mittels 1D- oder 2D-Flachbettelektrophorese oder -chromatographie getrennten Substanzen, bei dem nicht getrennte und getrennte Substanzen im Trennmedium für elektrophoretische oder chromatographische Trennungen mit einer Lichtquelle bestrahlt werden, und emittiertes Fluoreszenzlicht mit einem Detektor gemessen wird, dadurch gekennzeichnet, dass man (a) bei Einwirkung von UV-Licht im UV-Bereich Fluoreszenz emittierende Substanzen (b) im Trennmedium direkt mit UV-Licht einer Wellenlänge von 150 bis 320 nm bestrahlt und (c) die UV-Fluoreszenz bei Wellenlängen von 150 bis 400 nm mit einem UV-empfindlichen Detektor misst.
14. Verfahren gemäss Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die getrennten Substanzen vom Trennmedium durch Anlegen eines elektrischen Feldes senkrecht zur Ebene des Trennmediums auf eine aufgelegte Membran transferiert werden.
15. Verfahren gemäss Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran aus Nitrocellulose oder Polyvinylidenfluorid besteht, die in Westernblotverfahren eingesetzt werden.

16. Verfahren gemäss Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die transferierten Substanzbereiche mit unmarkierten Antikörpern behandelt werden, und dann deren Eigenfluoreszenz im UV-Bereich nach Anregung mit UV-Strahlung gemessen wird.

17. Verwendung der Vorrichtung gemäss Ansprüchen 1 bis 12 oder Anwendung des Verfahrens gemäss Ansprüchen 13 bis 16 zur Trennung und Bestimmung krankheitsspezifischer Substanzen in dem menschlichen oder tierischen Körper oder Pflanzen entnommenen Proben.

1/1

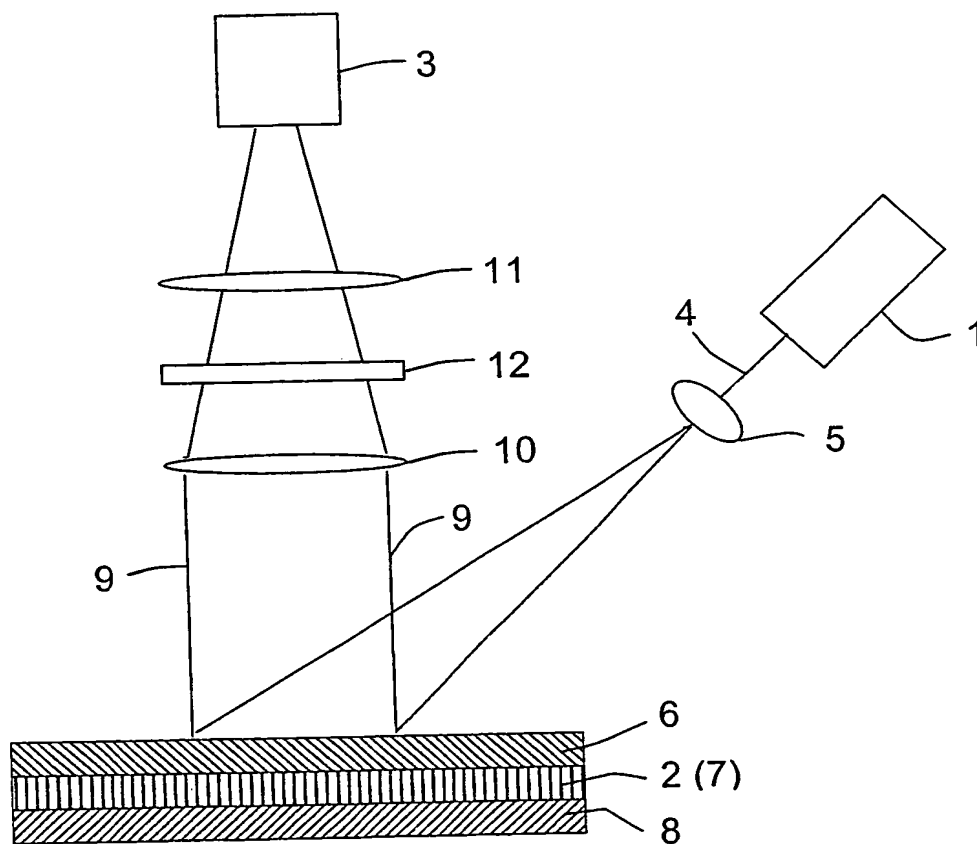


Fig. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/50350

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	R. E. MILOFSKY: "native fluorescence detection of nucleic acids and DNA restriction fragments in capillary electrophoresis" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 65, no. 2, 1993, pages 153-157, XP002261291 abstract	1
A	US 5 108 179 A (MYERS STEPHEN A) 28 April 1992 (1992-04-28) column 1, line 28 - line 57; figure 4 column 6, line 32 - line 36	1
A	US 5 192 407 A (CHEUNG CHAN K ET AL) 9 March 1993 (1993-03-09) column 5, line 29 - column 6, line 12	1
-/--		



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2003

Date of mailing of the international search report

25/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Duchatellier, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/50350

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MIDDENDORF L ET AL: "A two-dimensional infrared fluorescence scanner used for DNA analysis" PROCEEDINGS OF THE SPIE, SPIE, BELLINGHAM, VA, US, vol. 2388, no. 2388Advances i, 1995, pages 44-55, XP002099593 ISSN: 0277-786X the whole document -----	1
A	US 5 468 364 A (FUJII HIDEHIKO) 21 November 1995 (1995-11-21) abstract; figure 1 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/50350

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5108179	A	28-04-1992	NONE	
US 5192407	A	09-03-1993	US 5879528 A	09-03-1999
US 5468364	A	21-11-1995	JP 2792396 B2 JP 6043136 A	03-09-1998 18-02-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/50350

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N27/447

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Batr. Anspruch Nr.
A	R. E. MILOFSKY: "native fluorescence detection of nucleic acids and DNA restriction fragments in capillary electrophoresis" ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 65, Nr. 2, 1993, Seiten 153-157, XP002261291 Zusammenfassung ---	1
A	US 5 108 179 A (MYERS STEPHEN A) 28. April 1992 (1992-04-28) Spalte 1, Zeile 28 - Zeile 57; Abbildung 4 Spalte 6, Zeile 32 - Zeile 36 ---	1
A	US 5 192 407 A (CHEUNG CHAN K ET AL) 9. März 1993 (1993-03-09) Spalte 5, Zeile 29 - Spalte 6, Zeile 12 --- -/-	1

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. November 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25/11/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Duchatellier, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Detr. Anspruch Nr.
A	MIDDENDORF L ET AL: "A two-dimensional infrared fluorescence scanner used for DNA analysis" PROCEEDINGS OF THE SPIE, SPIE, BELLINGHAM, VA, US, Bd. 2388, Nr. 2388Advances i, 1995, Seiten 44-55, XP002099593 ISSN: 0277-786X das ganze Dokument -----	1
A	US 5 468 364 A (FUJII HIDEHIKO) 21. November 1995 (1995-11-21) Zusammenfassung; Abbildung 1 -----	1

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/50350

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5108179	A	28-04-1992	KEINE		
US 5192407	A	09-03-1993	US	5879528 A	09-03-1999
US 5468364	A	21-11-1995	JP	2792396 B2	03-09-1998
			JP	6043136 A	18-02-1994